

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 25 FEB 2004

WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

102 60 707.9

Anmeldetag:

23. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber:

BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur Veränderung des Gehalts von Spei-
cherstoffen in Pflanzen

IPC:

A 01 H 1/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Wallner

Verfahren zur Veränderung des Gehalts von Speicherstoffen in Pflanzen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Veränderung des Gehalts von Speicherstoffen in Pflanzen durch Einsatz von Leghemoglobin exprimierender transformierter Pflanzen, entsprechende Pflanzen sowie deren Verwendung.

Speicherstoffe in Pflanzen dienen als Reservestoffe und werden von pflanzlichen Geweben gebildet und intrazellulär abgelagert. Als Speicherstoffe dienen z. B. Polysaccharide (Kohlenhydrate wie Lichenin, Stärke, Glykogen, Polyfructosane), Proteine, Fette, auch Polyphosphate und Polyhydroxyalkanoate. Die Speicherstoffe können bei Bedarf wieder in den Stoff- und Energiewechsel eingeschleust werden, beispielsweise bei Nahrungsmangel, der Keimung von Samen, dem Wachstum und sonstigen energieverbrauchenden Vorgängen.

Speicherstoffe sind wertvolle Rohstoffe für die Ernährung (Getreide, Nüsse, Früchte, Obst, Gewürze etc.) und bilden die Basis vieler menschlicher Nahrungsmittel und können auch als Lieferanten für technische Fette und Öle dienen. Andere Speicherstoffe werden wegen ihrer pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffe arzneilich genutzt. (Quelle: CD Römpp Chemie Lexikon – Version 1.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1995).

Auch werden in zunehmendem Maße die Speicherstoffe als nachwachsende und ökologisch verträgliche Rohstoffe für die Industrie angewendet, wie dies z. B. durch die Verwendung von Stärke zur Herstellung von Verpackungsmaterialien oder z. B. von Pflanzenölen als Kraftstoffe, wie Biodiesel oder Schmierstoffe möglich ist.

Die sogenannten sekundären Stoffwechselprodukte (sek. Metaboliten, vgl. a. Stoffwechsel) von Pflanzen (z. B. Farbstoffe, Gifte, etherische Öle, Alkaloide, Fruchtsäuren) werden im allg. nicht zu den Speicherstoffen gezählt (Quelle: Römpp Lexikon Chemie – Version 2.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1999 "Reservestoffe").

10 In Pflanzen werden die Speicherstoffe in Samen oder Speicherorganen von Kohlenhydrat-Vorstufen gebildet. Dabei ist Saccharose die Primärquelle von Kohlenstoff und Energie, welche von den Blättern in die sich entwickelnden Samen bzw. in Speicherorgane transportiert wird. Die Saccharose in den Blättern wird dabei durch die aus der Photosynthese gewonnene Stärke gebildet. Die Saccharose, die in die sich entwickelnden Samen transportiert wird, dient neben der Synthese von Fettsäuren für die Speicherlipide auch zur Synthese von Speicherproteinen und Speicherstärke.

15 Insgesamt enthalten z. B. Samen drei verschiedene Formen an Speicherstoffen: Speicherlipide, Speicherproteine und Stärke. Je nach Pflanzen variieren dabei die Verhältnisse der drei Speicherstoffe zueinander. So enthalten Rapssorten z. B. etwa 48 % Speicherlipide, 19 % Stärke und 21 % Speicherproteine, während Sojabohne 22 % Lipide, 12 % Stärke und 37 % Proteine enthält (Biochemistry & Molecular Biology of the Plant ed. Buchanan, Gruissem, Jones 2000, American Society of Plant Physiologists) bezogen auf ihre Trockenmasse.

25 Die aus den pflanzlichen Ölen (Lipide) erhältlichen Fettsäuren sind von besonderem Interesse. Sie kommen beispielsweise als Grundstoffe für Weichmacher, Schmierstoffe, Tenside, Kosmetika usw. zum Einsatz oder werden in der Lebens- und Futtermittelindustrie als wertvolle Grundstoffe eingesetzt. So

ist beispielsweise die Bereitstellung von Rapsölen mit Fettsäuren mittlerer Kettenlänge von besonderem Interesse, da diese besonders für die Tensidherstellung begehrt sind.

- 5 Durch die gezielte Modulation pflanzlicher Stoffwechselwege mittels gentechnischer Verfahren kann der pflanzliche Metabolismus in einer Weise vorteilhaft verändert werden, die durch klassische Züchtungsmethoden nur über langwierige Schritte bzw. überhaupt nicht zu erreichen wären. So werden z. B. ungewöhnliche Fettsäuren, beispielsweise bestimmte mehrfach ungesättigte Fettsäuren, nur in bestimmten Pflanzen bzw. überhaupt nicht in Pflanzen synthetisiert und können deshalb nur durch Expression des entsprechenden Enzyms in transgenen Pflanzen gezielt hergestellt werden (z. B. Millar et al. (2000) Trends Plant Sci 5:95-101).
- 10
- 15 Stärke als Speicherstoff kann nicht nur in Samen eingelagert werden, sondern auch in anderen Speicherorganen. Wichtige Speicherorgane für Stärke sind dabei Hypokotyl und Wurzeln. Durch Vermehrung und Vergrößerung der Zellen des Rindenparenchyms entstehen Wurzelknollen, wie z. B. Kartoffelknollen oder bei Verdickung des Wurzelhalses Wurzelrüben, wie z. B. Zuckerrübe oder Yams.
- 20

So ist Stärke z. B. der Hauptbestandteil der Kartoffel-Trockensubstanz. Neben der Verwendung als Lebensmittel dient die Kartoffel daher auch als Futtermittel und als Rohstoff zur Gewinnung von Stärke und Alkohol. Weltweit wurden 1988 269,7 Mio. t Kartoffeln geerntet. (Quelle: CD Römpp Chemie Lexikon – Version 1.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1995).

25

Die Patente US 6,372,961, WO98/12913 und WO00/00597 beschreiben die Nutzung von Hemoglobin oder strukturverwandter Proteine (Myoglobin, bakterielles Hemoglobin) zur Erhöhung der Sauerstoffassimilation in Pflanzen. Damit soll die Keimung bzw. der Energiehaushalt der entsprechend transgenen Pflanzen verbessert sein auch unter Sauerstoffmangelbedingungen ein normales Wachstum gewährleistet werden. Auch sollen die Menge produzierter sekundärer Metabolite erhöht werden (WO98/12913 Seite 6, Zeile 24). Die Steigerung der Produktion von Speicherstoffen geht aus diesen Schriften nicht hervor.

10

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher den Gehalt von Speicherstoffen in Speicherorganen von Pflanzen zu erhöhen, um somit eine bessere Nutzung von Anbauflächen, Dünger usw. und eine bessere Ausbeute (oder Ertrag) mittels der Pflanzen zu erwirtschaften. Insbesondere soll die Produktion von Stärke oder Öl verbessert bzw. ermöglicht werden.

15

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß im erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung des Gehalts von Speicherstoffen in Pflanzen Leghemoglobin exprimierende transformierte Pflanzen eingesetzt werden. Die Aufgabe wird ebenfalls durch die Leghemoglobin exprimierende transformierte Pflanzen sowie deren Verwendung gelöst.

20

Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass durch Expression eines Leghemoglobins Speicherstoff-haltige transformierte Pflanzen produziert werden, die auf Grund ihres (höheren) Gehalts von Speicherstoffen eine bessere Nutzung von Anbauflächen, Dünger usw. erlauben und daher einen besseren Ertrag der Speicherstoffe, insbesondere Stärke und Öl erlauben. Somit

25

ist eine wirtschaftlich interessante Verwendung der erfindungsgemäßen Pflanzen möglich.

Das Leghemoglobin gehört zur Familie der Hemoglobin-Proteine, deren
5 Funktion die reversible Sauerstoffbindung und Versorgung ist. Es stammt aus
Wurzelknöllchen von Hülsenfrüchten (Leguminosen) und ist eine isolierbare
rote Substanz, die dem Myoglobin der Wirbeltiere ähnelt. Durch die reversible
Bindung von O₂ kann Leghemoglobin den hohen Sauerstoff-Bedarf bei der
Stickstoff-Fixierung durch die Knöllchenbakterien gewährleisten. Das Apoprotein
10 wird von den Pflanzenzellen und das Häm von den Bakterien gebildet
(Quelle: CD Römpf Chemie Lexikon – Version 1.0, Stuttgart/New York: Georg
Thieme Verlag 1995).

Unter Expression wird in der vorliegenden Anmeldung die Übertragung einer
15 genetischen Information ausgehend von DNA oder RNA in ein Genprodukt
(Polypeptid oder Protein, hier Leghemoglobin) verstanden und soll auch den
Begriff der Überexpression beinhalten, womit eine verstärkte Expression gemeint
ist, so dass das Fremdprotein oder das natürlich vorkommende Protein verstärkt
produziert werden oder einen großen Teil des gesamten Protein-
20 Gehaltes der Wirtszelle ausmachen.

Unter Transformation wird die Übertragung einer genetischen Information in
einen Organismus, insbesondere Pflanze verstanden. Darunter sollen alle
dem Fachmann bekannten Möglichkeiten zur Einschleusung der Information
25 fallen, z. B. Mikroinjektion, Elektroporation, Teilchenbeschuss (Partikel-
bombardement), Agrobakterien oder Chemikalien vermittelte Aufnahme (z. B.
Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonat-
faser-Technik). Die genetische Information kann z. B. als DNA, RNA, Plasmid

und auf sonstige Weise in die Zellen eingebracht und entweder durch Rekombination ins Wirtsgenom eingebaut, in freier Form oder unabhängig als Plasmid vorliegen. Eine transformierte Pflanze im Sinne der Erfindung ist also eine gentechnisch veränderte Pflanze.

5

Unter Speicherstoffe werden Polysaccharide, vorzugsweise Kohlenhydrate, Proteine, Fette, Polyphosphate und Polyhydroxyalkanoate, besonders bevorzugt Lichenin, Stärke, Glykogen, Polyfructosane verstanden.

- 10 Unter den aufgezählten Verbindungen werden Kohlenhydrate und Fette ganz besonders bevorzugt. Höchst bevorzugt als Speicherstoffe sind Stärke und Öl.

- 15 Stärke ist dem Fachmann bekannt und es wird für weitere Informationen auf das Römpp Chemie Lexikon – CD Version 2.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1999, verwiesen.

- 20 "Öl" umfasst im Sinne der Erfindung neutrale und/oder polare Lipide und Mischungen derselben. Beispielfhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 aufgeführten zu nennen.

Tabelle 1: Pflanzliche Lipidklassen

Neutrale Lipide	Triacylglycerol (TAG)
	Diacylglycerol (DAG)
	Monoacylglycerol (MAG)
Polare Lipide	Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)
	Digalactosyldiacylglycerol (DGDG)

	Phosphatidylglycerol (PG)
	Phosphatidylcholin (PC)
	Phosphatidylethanolamin (PE)
	Phosphatidylinositol (PI)
	Phosphatidylserin (PS)
	Sulfoquinovosyldiacylglycerol

- Neutrale Lipide meint bevorzugt Triacylglyceride. Sowohl die neutralen als auch die polaren Lipide können ein breites Spektrum an verschiedenen Fettsäuren enthalten. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 2 aufgeführten Fettsäuren zu nennen.

Tabelle 2: Übersicht über verschiedene Fettsäuren (Auswahl)

¹ Kettenlänge:Anzahl der Doppelbindungen

* nicht natürlicherweise in Pflanzen vorkommend

10

Nomenklatur ¹	Name
16:0	Palmitinsäure
16:1	Palmitoleinsäure
16:3	Roughaninsäure
18:0	Stearinsäure
18:1	Ölsäure
18:2	Linolsäure
18:3	Linolensäure
γ -18:3	Gamma-Linolensäure*
20:0	Arachidinsäure
22:6	Docosahexanonsäure (DHA) *
20:2	Eicosadienonsäure

20:4	Arachidonsäure (AA) *
20:5	Eicosapentaenosäure (EPA) *
22:1	Erucasäure

Für weitergehende Informationen wird ebenfalls auf das Römpp Chemie Lexikon – CD Version 2.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1999 verwiesen.

5

Erfindungsgemäß eignen sich alle Pflanzen zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Bevorzugt werden Kartoffeln, Arabidopsis thaliana, Raps, Sojabohnen, Erdnüsse, Mais, Maniok, Yams, Reis, Sonnenblumen, Roggen, Gerste, Hopfen, Hafer, Hart und Weichweizen, Lupinen, Erbsen, Klee, Rüben, Kohl, Reben usw. wie sie z. B. aus der Verordnung über das Artenverzeichnis zum Saatgutverkehrsgesetz (Blatt für PMZ 1986 S. 3, zuletzt geändert Blatt für PMZ 2002 S. 68) entnehmbar sind, eingesetzt.

10

Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr sowie alle Arten von Gräsern. Besonders bevorzugt aus der Familie der Gramineae sind Reis, Mais, Weizen und Gerste.

15
20

Bevorzugte dikotyledone Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula,

25

- Compositae, besonders die Gattung *Lactuca*, ganz besonders die Art *sativa* (Salat),
- 5 - Cruciferae, besonders die Gattung *Brassica*, ganz besonders die Arten *napus* (Raps), *campestris* (Rübe), *oleracea* cv *Tastie* (Kohl), *oleracea* cv *Snowball Y* (Blumenkohl) und *oleracea* cv *Emperor* (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung *Arabidopsis*, ganz besonders die Art *thaliana* sowie Kresse oder Canola,
- 10 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini,
- Leguminosae besonders die Gattung *Glycine*, ganz besonders die Art *Glycine max* (Sojabohne) sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss.
- 15 - Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse *Lamiidae* wie beispielsweise *Coffea arabica* oder *Coffea liberica* (Kaffeestrauch),
- Solanaceae besonders die Gattung *Lycopersicon*, ganz besonders die Art *esculentum* (Tomate) und die Gattung *Solanum*, ganz besonders die Art *tuberosum* (Kartoffel) und *melongena* (Aubergine) sowie Tabak oder Paprika,
- 20 - Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse *Dilleniidae* wie beispielsweise *Theobroma cacao* (Kakaostrauch),
- 25 - Theaceae, bevorzugt der Unterklasse *Dilleniidae* wie beispielsweise *Camellia sinensis* oder *Thea sinensis* (Teestrauch),

- Umbelliferae, besonders die Gattung *Daucus* (ganz besonders die Art *carota* (Karotte)) und *Apium* (ganz besonders die Art *graveolens dulce* (Selderie)) und andere mehr; und die Gattung *Capsicum*, ganz besonders die Art *annuum* (Pfeffer),
5
 - sowie Lein, Soja, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.
10
- Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielfhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel *Hepaticae* (Leberblümchen) und *Musci* (Moose); Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm
15 und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gneta-
len, die Familien der *Rosaceae* wie Rose, *Ericaceae* wie *Rhododendrons* und Azaleen, *Euphorbiaceae* wie Weihnachtssterne und Krokus, *Caryophyllaceae* wie Nelken, *Solanaceae* wie Petunien, *Gesneriaceae* wie das Usambaraveilchen, *Balsaminaceae* wie das Springkraut, *Orchidaceae* wie Orchideen, *Iridaceae* wie Gladiolen, *Iris*, *Freesie* und Krokus, *Compositae* wie Ringelblume,
20 *Geraniaceae* wie Geranien, *Liliaceae* wie der Drachenbaum, *Moraceae* wie *Ficus*, *Araceae* wie *Philodendron* und andere mehr.
- Besonders interessant ist der Einsatz von Ölpflanzen, d.h. Pflanzen, die bereits natürlicherweise einen hohen Ölgehalt aufweisen und/oder zu industriellen Gewinnung von Ölen verwendet werden. Diese Pflanzen können einen hohen Ölgehalt und/oder aber eine besondere, industriell interessante Fettsäurezusammensetzung aufweisen. Bevorzugt sind Pflanzen, die einen Lipi-
25

danteil von mindestens 1 Gew.-% aufweisen. Ölpflanzen umfassen beispielhaft: *Bovago officinalis* (Borretsch); *Brassica* Arten wie *B. campestris*, *B. napus*, *B. rapa* (Senf oder Raps); *Cannabis sativa* (Hanf); *Curthamus tinctorius* (Färberdiestel); *Cocos nucifera* (Kokusnuss); *Crambe abyssinica* (Krambe);
5 *Cuphea* Arten (*Cuphea* Arten liefern fettsäuren von mittlerer Kettenlänge insbesondere für industrielle Anwendungen); *Elaeis guinensis* (Afrikanische Ölpalme); *Ekeis oleiferu* (Amerikanische Ölpalme); *Glycine max* (Sojabohne); *Gossypium hirsutum* (Amerikanische Baumwolle); *Gossypium barbadense* (Ägyptische Baumwolle);
10 *Gossypium herbaceum* (Asiatische Baumwolle Cotton); *Helianthus annus* (Sonnenblume); *Linum usitatissimum* (Lein oder Flachs); *Oenethem biennis* (Evening primrose); *Ozea europea* (Olive); *Oryza sativa* (Rice); *Ricinus communis* (Castor); *Sesamum indicum* (Sesam); *Glycine max* (Sojabohne); *Triticum* Arten (Weizen); *Zea maize* (Mais) sowie verschiedene Nussarten wie beispielsweise Walnuss oder Mandel.

15

Wenn es sich bei den verwendeten Pflanzen um solche zur Gattung der Leguminosen (Hülsenfrüchte) gehörenden Pflanzen handelt, so fällt unter die Erfindung die Expression von Fremdproteinen (Leghemoglobinen), d. h. in der Natur nicht-symbiontisch vorkommenden Leghemoglobinen oder die Veränderung der Pflanzen derart, dass sie das natürlich vorkommende Leghemoglobin überexprimieren.

20

Höchst bevorzugt sind Kartoffeln, *Arabidopsis thaliana* und Raps.

25 Vorteilhaft ist es, wenn die vorgenannten Pflanzen ein Leghemoglobin ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Leghemoglobin aus den Pflanzen *Lupinus luteus* (LGB1_LUPLU, LGB2_LUPLU), *Glycine max* (LGBA_SOYBN, LGB2_SOYBN, LGB3_SOYBN), *Medicago sativa* (LGB1-4_MEDSA), *Medi-*

5 *cago trunculata* (LGB1_MEDTR), *Phaseolus vulgaris* (LGB1_PHAVU, LGB2_PHAVU), *Vicia faba* (LGB1_VICFA, LGB2_VICFA), *Pisum sativum* (LGB1_PEA, LGB2_PEA), *Vigna unguiculata* (LGB1_VIGUN), *Lotus japonicus* (LGB_LOTJA), *Psophocarpus tetragonolobus* (LGB_PSOTE), *Sesbania rostrata* (LGB1_SESRO), *Casuarina glauca* (HBPA_CASGL) und *Canvalaria lineata* (HBP_CANLI) exprimieren. In Klammern sind die jeweiligen Swiss-Prot Datenbankeinträge vermerkt.

10 Besonders vorteilhaft sind Pflanzen, die die Sequenz Nr. 1 codierend für Leghemoglobin aufweisen. Bevorzugterweise wird Leghemoglobin aus *Lotus japonicus* eingesetzt. Dann produzieren die transformierten Pflanzen Speicherstoffe in erhöhtem Ausmaß.

15 Unter die Erfindung fallen auch Pflanzen, die zur Produktion von Speicherstoffen ein Leghemoglobin, insbesondere ein Leghemoglobin gemäß Sequenz Nr. 1 exprimieren.

In einer bevorzugten Variante der Erfindung handelt es sich um Pflanzen, die das Leghemoglobin speicherorganspezifisch exprimieren.

20

Die genannten Pflanzen lagern die Speicherstoffe in der Regel in bestimmten Organen ab. Dies sind z. B. Zwiebeln, Knollen, Samen, Körner, Nüsse, Blätter usw. Unter Speicherorgane im Sinne der Erfindung sind auch Früchte zu verstehen. Früchte sind die Sammelbezeichnung für die den Samen als
25 Nährgewebe umhüllenden Organe der Pflanzen. Dabei ist nicht nur an die eßbaren Früchte, insbesondere an das Obst, aber auch an Hülsenfrüchte, Getreide, Nüsse, Gewürze zu denken, sondern auch an offiziell genutzte

Drogen (s. Fructus, Samen). Natürlich kann auch eine Speicherung der Speicherstoffe in der gesamten Pflanze stattfinden.

5 Bevorzugterweise wird das Leghemoglobin knollenspezifisch oder samen-spezifisch exprimiert.

10 Als Pflanzen kommen alle zuvor genannten in Betracht. Es ist besonders bevorzugt, wenn es sich um knollenproduzierende Pflanzen, insbesondere Kartoffel-Pflanzen oder um samenproduzierende Pflanzen, insbesondere Arabidopsis thaliana oder Raps handelt.

15 Die gewebespezifische Expression kann z. B. durch Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erreicht werden. Eine solche gewebespezifische Expression ist beispielsweise bekannt aus der US 6,372,961 B1 Spalte 11, Zeilen 44 ff.

20 Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Nukleotidsequenz gemäß Sequenz Nr. 1 codierend für Leghemoglobin zur Verwendung in einer Pflanze und eine entsprechende Genstruktur oder Vektor sowie deren Verwendung zur Transformation einer Pflanze mit der Erfindung.

Insbesondere fällt unter die Erfindung auch die Verwendung einer Leghemoglobin codierenden Nukleotidsequenz, die mit der Sequenz Nr. 1 zu ca. 70 % identisch ist.

25

Unter Nukleotidsequenz werden alle Nukleotidsequenzen verstanden, die (i) exakt den dargestellten Sequenzen entsprechen; oder (ii) mindestens eine Nukleotidsequenz umfassen, die innerhalb des Bereichs der Degeneration des

genetischen Codes den dargestellten Sequenzen entspricht; oder (iii) mindestens eine Nukleotidsequenz umfasst, die mit einer zur Nukleotidsequenz (i) oder (ii) komplementären Nukleotidsequenz hybridisiert, und gegebenenfalls (iiii) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i) umfasst. Dabei bedeutet der Begriff "funktionsneutrale Sinnmutationen" den Austausch chemisch ähnlicher Aminosäuren, wie z. B. Glycin durch Alanin oder Serin durch Threonin.

Erfindungsgemäß sind auch die den kodierenden Bereichen (Strukturgenen) vorausgehenden (5'-oder upstream) und/oder nachfolgenden (3'-oder downstream) Sequenzbereiche eingeschlossen. Insbesondere sind hierin Sequenzbereiche mit regulatorischer Funktion inbegriffen. Sie können die Transkription, die RNA-Stabilität oder das RNA Processing sowie die Translation beeinflussen. Beispiele für regulatorische Sequenzen sind u. a. Promotoren, Enhancer, Operatoren, Terminatoren oder Translationsverstärker.

15

Unter die jeweiligen Proteine (Leghemoglobine) fallen auch Isoformen, die als Proteine mit gleicher oder vergleichbarer Wirkung verstanden werden, die jedoch eine unterschiedliche Primärstruktur aufweisen.

20

Unter modifizierten Formen sind erfindungsgemäß Proteine zu verstehen, bei denen Änderungen in der Sequenz, beispielsweise am N- und/oder C-Terminus des Polypeptids oder im Bereich konservierter Aminosäuren vorliegen, ohne jedoch die Funktion des Proteins zu beeinträchtigen. Diese Veränderungen können in Form von Aminosäureaustauschen nach bekannten Methoden vorgenommen werden.

25

Die Erfindung wird unter Bezugnahme auf die folgenden Versuche beispielhaft beschrieben.

Beispiele

1. Modellorganismen

Als Modellorganismen für die Experimente wurden Kartoffel und *Arabidopsis thaliana* eingesetzt. Beide Pflanzenarten repräsentieren ein Mitglied der höheren Pflanzen (Samenpflanzen). Sie können aufgrund des hohen Grades an Homologie ihrer DNA-Sequenzen bzw. Polypeptidsequenzen als Modellpflanzen für andere Pflanzenarten eingesetzt werden.

2. Allgemeine Verfahren

10 a) Anzucht von Kartoffel oder *Arabidopsis* Pflanzen

Arabidopsis Pflanzen wurden entweder auf Murashige-Skoog Medium mit 0,5 % Saccharose (Ogas et al., 1997 Science 277:91-94) oder auf Erde gezogen (Focks & Benning, 1998 Plant Physiology 118:91-101). Um einheitliche Keimungs- und Blühzeiten zu erreichen, wurden die Samen nach Ausplattieren bzw. Ausstreuen auf Erde zwei Tage bei 4 °C stratifiziert. Nach der Blüte wurden die Schoten markiert. Entsprechend der Markierungen wurden dann Schoten mit einem Alter von 6-20 Tagen nach der Blüte geerntet. Kartoffelpflanzen wurden nach Dietze et al., 1995 (Gene Transfer to Plants, ed. Potrykus und Spangenberg, Springer Lab Manual, Berlin, Heidelberg, 24-29) angezogen.

20 b) Isolierung von totalRNA und poly-A⁺ RNA aus Pflanzen

Für die Herstellung von Expressionskonstrukten wird RNA bzw. polyA⁺ RNA isoliert. RNA wurde aus Schoten von *Arabidopsis* oder aus Knollen von Kartoffel bzw. Wurzeln von *Lotus japonicus* nach folgender Vorschrift isoliert: Pflanzenmaterial im Alter von 6 - 40 Tage wurde geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Material wurde vor der weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. 75 mg des Materials wurden im gekühlten Mörser zu ei-

- nem feinen Pulver gemahlen und mit 200 µL des Lysis-Puffers aus dem Ambion RNAqueos-Kit versetzt. Die Isolierung der totalen RNA wurde dann nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wurde mit 50 µL Elutionspuffer (Ambion) eluiert und die Konzentration durch Absorption einer 1.100 verdünnten Lösung am Photometer (Eppendorf) bei 260 nm bestimmt. 40ug/ml RNA entspricht dabei einer Absorption von 1. Die RNA-Lösungen wurden mit RNase freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt. Die Konzentrationen wurden durch Agarosegelelektrophorese überprüft.
- 5
- 10 Zur Isolierung von polyA⁺ RNA wurde oligo(dT)-Zellulose von Amersham Pharmacia nach Herstellerangaben verwendet. RNA bzw. polyA⁺ RNA wurde bei -70 °C gelagert.

3. Konstruktion der cDNA-Bank

- 15 Zur Konstruktion der cDNA-Bank aus Lotus japonicus-RNA wurde die Erststrangsynthese unter Verwendung von Reverser Transkriptase aus Maus-Leukämie-Virus (Clontech) und Oligo-d(T)-Primern, die Zweitstrangsynthese durch Inkubation mit DNA-Polymerase I, Klenow-Enzym und RNase H-Spaltung bei 12 °C (2 Std.), 16 °C (1 Std.) und 22 °C (1 Std.) erzielt. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65 °C (10 min) gestoppt und anschließend auf Eis überführt. Doppelsträngige DNA-Moleküle wurde mit T4-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) bei 37 °C (30 min) mit glatten Enden versehen. Die Nukleotide wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Sephadex-G50-Zentrifugiersäulen entfernt. EcoRI/NotI-Adapter (Phar-
- 20
- 25 macia, Freiburg, Deutschland) wurden mittels T4-DNA-Ligase (Roche, 12°C, über Nacht) an die cDNA-Enden ligiert, mit NotI nachgeschnitten und durch Inkubation mit Polynukleotidkinase (Roche, 37 °C, 30 min) phosphoryliert. Dieses Gemisch wurde der Trennung auf einem Low-Melting-Agarose-Gel

5 unterworfen. DNA-Moleküle über 200 Basenpaaren wurden aus dem Gel eluiert, Phenol-extrahiert, auf Elutip-D-Säulen (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) konzentriert und in den Klonierungsvektor pSPORT1 (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert, wobei Material des Herstellers verwendet und seine Anweisungen befolgt wurden.

4. DNA-Sequenzierung und Computeranalyse

10 cDNA-Banken, wie unter Punkt 2 beschrieben, wurden zur DNA-Sequenzierung nach Standardverfahren, insbesondere durch das Kettenterminationsverfahren unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland), verwendet. Die Sequenzierung zufälliger, vereinzelter Klone wurde anschließend an die präparative Plasmidgewinnung aus cDNA-Banken über in vivo-Massenexcision und Retransformation von DH5 α auf Agarplatten durchgeführt (Einzelheiten zu Material und Protokoll von Stratagene, Amsterdam, 15 Niederlande). Plasmid-DNA wurde aus über Nacht gezüchteten E. coli-Kulturen, die in Luria-Brühe mit Ampicillin (siehe Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)) gezüchtet worden waren, an einem Qiagen-DNA-Präparations-Roboter (Qiagen, Hilden) nach 20 den Protokollen des Herstellers präpariert.

Die Sequenzen wurden unter Verwendung des Standard-Softwarepakets EST-MAX, das kommerziell von Bio-Max (München, Deutschland) geliefert wird, prozessiert und annotiert. Durch Nutzung von Vergleichsalgorithmen und unter Verwendung einer Suchsequenz wurde mithilfe des BLAST- 25 Programms nach homologen Genen gesucht (Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402).

5. Herstellung der Expressionskonstrukte für die knollenspezifische Expression in Kartoffel bzw. die samenspezifische Expression in Arabidopsis:

a) Knollenspezifische Expression:

- 5 Das Leghemoglobin-Gen Ljlb wurde aus dem Vektor pSportl mit NotI und KpnI geschnitten, wobei die NotI Schnittstelle durch Inkubation mit Klenow-Enzym aufgefüllt wurde. Für die Ligation in den Vektor pART33 wurde dieser mit BamHI verdaut, dann die Schnittstelle durch Inkubation mit Klenow-Enzym aufgefüllt und anschliessend mit KpnI verdaut. pART33 enthält bereits
10 den B33-Promoter (1459 bp; Liu XJ, Prat S, Willmitzer L, Frommer WB (1990) cis regulatory elements directing tuber-specific and sucrose-inducible expression of a chimeric class I patatin promoter/GUS-gene fusion. Mol Gen Genet. 223(3):401-6) sowie den OCS-Terminator (766 bp) für die knollenspezifische Expression. Das gesamte Konstrukt wurde mit NotI aus pART33 geschnitten
15 und in den Vektor für die Pflanzentransformation pART27 einkloniert.

b) Samenspezifische Expression:

- Das Leghemoglobin-Gen Ljlb wurde aus dem Vektor pSportl mit NotI geschnitten und die Enden wurden mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Für die Ligation in den Vektor pBINUSP wurde der Vektor mit BamHI verdaut und für
20 15 min mit Klenow-Fragment bei 37 °C behandelt. Anschließend wurde für über Nacht bei 4 °C ligiert.

6. Plasmide für die Pflanzentransformation

- 25 Zur Pflanzentransformation wurden binäre Vektoren, wie pBinAR verwendet (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230). Die Konstruktion der binären Vektoren erfolgte durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA. 5' der cDNA aktivierte ein Pflanzenpromotor

die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befand sich 3' von der cDNA.

5 Die gewebespezifische Expression ließ sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Die samenspezifische Expression wurde Einklonierung des Napin- oder des LeB4- oder der USP-Promotors 5' der cDNA erreicht. Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement könnte verwendet werden. Zur konstitutiven Expression in den ganzen Pflanzen lässt sich der CaMV-35S-Promotor verwenden.

10

7. Transformation von Agrobacterium und Pflanzentransformation

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann zum Beispiel unter Verwendung des GV3101- (pMP90-) (Koncz und Schell, Mol. Gen. Genet. 204 (1986) 383-396) oder LBA4404- (Clontech) Agrobacterium tumefaciens-
15 Stamms durchgeführt werden. Die Transformation des Bakteriums kann durch dem Fachmann bekannte Standard-Transformationstechniken durchgeführt werden (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 12 (1984), 4777-4788).

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation selbst kann unter Verwendung von dem Fachmann ebenfalls bekannte Standard-Transformations- und Regenerationstechniken durchgeführt werden (Gelvin, Stanton B., Schilperoort, Robert A., Plant Molecular Biology Manual, 2. Aufl., Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993, 360 S.,
25 ISBN 0-8493-5164-2).

Die Transformation mittels *Agrobacterium* von *Arabidopsis thaliana* wurde nach der Methode von Bechthold et al., 1993 (C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie., 316, 1194-1199) durchgeführt. Die Methode wurde dahingegen modifiziert, dass auf die Vakuuminfiltration verzichtet wurde.

5

Für die Transformation wurden *Arabidopsis thaliana* Col0 Samen auf befeuchteter Erde ausgesät, zwei Tage bei 4 °C stratifiziert und 4-6 Wochen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 21 °C) angezogen. Die Pflanzen wurden dann zur Blühinduktion in Langtagbedingungen (16 h Licht, 21 °C) überführt. Nach etwa 10 Tagen ist die Infloreszenz (Blütenstand) gross genug für das Eintauchen. Die Infloreszenz wird in eine *Agrobacterium* Suspension mit ½ MS Lösung (Murashige und Skoog, s.u.) pH 5,7, 5 % Saccharose, 44 µM Benzylaminopurin (Sigma) und 0,03 % Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA) getaucht. Die optische Dichte der *Agrobacterium* Suspension bei 600 nm sollte 0,8 betragen. Die Bakterien werden zuvor im YEB Medium (0,5 % Bactotrypton, 0,5 % Bactopeptone, 0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Saccharose und 2mM MgCl₂) angezogen.

20

Nach Eintauchen der Pflanzen wurden diese für etwa drei Wochen weiter befeuchtet. Dann wurde die Bewässerung eingestellt und die Pflanzen trockneten für die Samengewinnung ab. Die erhaltenen Samen wurden auf Platten mit ½ MS Lösung, pH 5,7, 50 µg Kanamycin, 250 µg Timenten und 0,8 % Agar ausgelegt. Resistente Keimlinge wurden vereinzelt und auf Erde pikiert.

25

Die Transformation von Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) erfolgte nach der Methode von Dietze et al. in Gene transfer to plants (eds. I. Potrykus and G. Spangenberg, Springer Lab Manual, 1995, S. 24-29). Als Ausgangsmaterial wurde die Sorte Désirée verwendet.

Zur Transformation wurden fünf bis sechs Blätter einer sterilen Sprossen-
Kultur der Kartoffelvarietät Desiree vorsichtig in 10 ml einer 2 MS Lösung
(Standard MS Medium nach Murashige and Skoog (1962) A revised medium
for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*,
5 15, 473-497.) mit zusätzlich 2 % Saccharose equilibriert. Aus den Blättern
werden vertikal zur Mittelrippe 1 - 2 mm lange Stücke herausgeschnitten und
in frisches 2 MS Medium gegeben. Zu dem frischen Medium werden 50 µl
einer Agrobacterium-Lösung zugegeben, die mit dem T-Plasmid pART27-
JpLeg transformiert wurden. Die Agrobacterium-Lösung wird über die
10 Blattstücke verteilt und die Platten werden für zwei Tage im Dunkeln bei 22 -
24 °C inkubiert. Nach zwei Tagen werden die Blattstücke auf CIM Medium
(MS Medium mit 1,5 % Glucose, 5 mg/l NAA, 0,1 mg/l BAP, 250 mg/l Claforin
und 50 mg/l Kanamycin oder Hygromycin) umgesetzt und 7 Tage inkubiert.
Dann werden die Blattstücke auf SIM Medium (MS Medium mit 2 mg/l Zeatin,
15 0,02 mg/l NAA, 0,02 mg/l GA3, 250 mg/l Claforin und 50 mg/l Kanamycin o-
der Hygromycin) umgesetzt. Nach 1 - 2 Wochen können dann die entstande-
nen transgenen Sprosse (1 - 1,5 cm lang) abgeschnitten und auf RIM Medi-
um (MS Medium mit 250 mg/l Claforin) umgesetzt werden. Nach 3 - 4 Wo-
chen haben die Sprossen Blätter und Wurzel ausgebildet und die Pflanzen
20 können auf Erde pikiert werden.

Entsprechend dieser Methode können 2 - 3 unabhängige transgene Linien
pro eingesetztes Blatt erhalten werden.

25 Die alternativ mögliche Pflanzentransformation unter Verwendung von Teil-
chenbeschuß, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die
Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling

und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).

8. Untersuchung der Expression des Leghemoglobins in der transformierten Pflanze

Die Aktivität des Leghemoglobins in den transformierten Pflanzen wurde auf der Transkriptions- und/oder der Translationsebene gemessen.

- Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Menge an Transkription des Gens (ein Hinweis auf die Menge an RNA, die für die Translation des Genproduktes zur Verfügung steht) ist die Durchführung eines Northern-Blots wie unten ausgeführt (als Bezugsstelle siehe Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York, oder den oben erwähnten Beispielteil), wobei ein Primer, der so gestaltet ist, daß er an das Leghemoglobin bindet, mit einer nachweisbaren Markierung (gewöhnlich radioaktiv oder chemilumineszent) markiert wird, so daß, wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix transferiert und mit dieser Sonde inkubiert wird, die Bindung und das Ausmaß der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen (Leghemoglobin) anzeigt. Diese Information zeigt den Grad der Transkription des transformierten Gens an. Zelluläre Gesamt-RNA kann aus Zellen, Geweben oder Organen mit mehreren Verfahren, die alle im Fachgebiet bekannt sind, wie zum Beispiel das von Bormann, E. R., et al. (1992) Mol. Microbiol. 6:317-326 beschriebene, präpariert werden.

Northern-Hybridisierung:

Für die RNA-Hybridisierung wurden 20 μ g Gesamt-RNA oder 1 μ g poly(A)⁺-RNA mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen mit einer Stärke von 1,25 %

unter Verwendung von Formaldehyd, wie beschrieben in Amasino (1986, Anal. Biochem. 152, 304) aufgetrennt, mittels Kapillaranziehung unter Verwendung von 10 x SSC auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) übertragen, mittels UV-Licht immobilisiert und 3
5 Stunden bei 68 °C unter Verwendung von Hybridisierungspuffer (10 % Dextransulfat Gew./Vol., 1 M NaCl, 1 % SDS, 100 mg Heringssperma-DNA) vorhybridisiert. Die Markierung der DNA-Sonde mit dem Highprime DNA Labeling-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) erfolgte während der Vorhybridisierung unter Verwendung von alpha-³²P-dCTP (Amersham Pharmacia,
10 Braunschweig, Deutschland). Die Hybridisierung wurde nach Zugabe der markierten DNA-Sonde im gleichen Puffer bei 68 °C über Nacht durchgeführt. Die Waschschriffe wurden zweimal für 15 min unter Verwendung von 2 X SSC und zweimal für 30 min unter Verwendung von 1 X SSC, 1 % SDS, bei
15 68 °C durchgeführt. Die Exposition der verschlossenen Filter wurde bei -70 °C für einen Zeitraum von 1 bis 14 Tagen durchgeführt.

9. Analyse der Auswirkung des rekombinanten Leghemoglobins auf die
Produktion des gewünschten Produktes

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Cilia-
20 ten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären
Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h.
25 von Lipiden oder Kohlenhydrate) untersucht wird. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hoch-

- leistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bio-separations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).
- 15 Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.
- 25 Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und

Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für

- 1 Std. bei 90 °C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 Mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170 °C und 240 °C für 20 min und 5 min bei 240 °C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.
- 10 10. Analyse des Öl-Gehalts von transformierten Leghemoglobin exprimierenden Arabidopsis
- Für die Öl-Analyse der mit dem Leghemoglobin transformierten Arabidopsis Pflanzen wurde folgendes Protokoll angewendet:
- Die Extraktion der Lipide aus Samen wird nach der Methode von Bligh & Dyer, 1959 Can. J. Biochem. Physiol. 37:911 durchgeführt. Dazu werden 5 mg Arabidopsis Samen in 1,2 ml Qiagen-Microtubes (Qiagen, Hilden) auf einer Sartorius (Göttingen) Mikrowaage abgewogen. Das Samenmaterial wird mit 500 µL Chloroform/Methanol (2:1; enthält Mono-C17-glycerin von Sigma als internen Standard) in der Rätschmühle MM300 der Firma Retsch (Haan) homogenisiert und 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500 µL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 erfolgt die Phasentrennung. Von der organischen Phase werden 50 µL abgenommen, mit 1500 µL Chloroform verdünnt und 5 µL auf die Kapillaren Chromarods SIII der Firma Jatroscan (SKS, Bechenheim) aufgetragen. Nach Auftrag der Proben werden diese für 15 min in einer Dünnschichtkammer, die gesättigt ist mit 6:2:2 Chloroform: Methanol: Toluol in einem ersten Schritt aufgetrennt. Nach Ablauf der Zeit werden die Kapillaren 4 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann für 22 min in eine Dünnschichtkammer, die gesättigt ist mit 7:3 n-Hexan:Diethylether gestellt.

Nach einem weiteren Trocknungsschritt für 4 min bei Raumtemperatur werden die Proben in einem Latroscan MK-5 (SKS, Bechenheim) entsprechend Fraser & Taggart, 1988 J. Chromatogr. 439:404 analysiert. Folgende Parameter wurden für die Messungen eingestellt: Slice width 50 msec, Treshold

5 20 mV, Noise 30, Skim ratio 0.

Die Quantifizierung der Daten erfolgte anhand des internen Standards Mono-C17-glycerin (Sigma) sowie einer erstellten Eichkurve mit Tri-C17-glycerin (Sigma) mittels des Programms ChromStar (SKS, Beichenheim).

- 10 Für die quantitative Bestimmung der Ölgehalte wurden Samen von jeweils 10 Pflanzen derselben unabhängigen transgenen Linie analysiert. Insgesamt wurde der Ölgehalt von 30 transgene Linien der T1 Generation, 10 transgene Linien mit je 10 Pflanzen der T2 Generation und 5 transgene Linien mit je 10 Pflanzen der T3 Linien bestimmt. Dabei zeigen die transgenen Pflanzen ei-
- 15 nen signifikant höheren Ölgehalt als entsprechend gleichbehandelte Kontrollpflanzen.

11. Bestimmung des Stärkegehaltes in transformierten Leghemoglobin exprimierenden Kartoffelpflanzen

- 20 Zur Bestimmung des Stärkegehaltes von Knollen der Kartoffelpflanzen wird die Dichtemessung nach Schéele C. von, Svensson, G. and Rasmusson J., Die Bestimmung des Stärkegehalts und der Trockensubstanz der Kartoffel mit Hilfe des spezifischen Gewichts. Landw. Vers Sta. 127: 67-96, 1937 eingesetzt. Anhand der Dichtemessung kann dann durch Umrechnung auf den
- 25 Stärkegehalt geschlossen werden. Zur Umrechnung wurde folgende Formel angewendet:

Die spezifische Dichte wurde durch Wiegen der Knollen sowohl in der Luft als auch in Wasser bestimmt, wobei x die Masse in Luft und y die Masse in Was-

ser ist. Die spezifische Dichte ergibt sich dann aus $x/(x-y)$. Desweiteren wurden folgende Beziehungen aus 560 gemessenen Proben gemittelt (Burton W.G. (1989) The Potato. Longman, New York):

5 $\% \text{ Trockenmasse} = 24.182 + [211.04 * (\text{sp. Dichte} - 1.0988)]$

$$\% \text{ Stärke} = 17.546 + [199.07 * (\text{sp. Dichte} - 1.0988)]$$

10 Für die Messungen der Leghemoglobin exprimierenden Pflanzen und der Kontrollpflanzen zu Vergleichszwecken wurden unterschiedlich große Kartoffelknollen verschiedener transgenen Linien sowie der Kontrollpflanzen eingesetzt. Die unterschiedlichen Größen dienen dazu, den beobachteten Effekt in allen Knollengrößen zu reproduzieren.

15 In Tabelle 3 sind beispielhaft die Werte einer transgenen Linie im Vergleich zu Kontrollpflanzen gezeigt. Dabei konnte eine signifikante Erhöhung des Stärkegehalts in den Leghemoglobin exprimierenden transformierten Pflanzen gemäß der Erfindung beobachtet werden (siehe Zeile Erhöhung in %). Für weitere transgene Linien werden ähnliche Werte erreicht.

20 Die Aufarbeitung bzw. Gewinnung von Stärke aus den Leghemoglobin-exprimierenden Kartoffeln kann nach dem Fachmann bekannten üblichen verfahren z. B. gemäss den Angaben der US Patentanmeldung 2001/0041199 A1, Seite 4, Beispiel 1, erfolgen.

Tabelle 3: Bestimmung der spezifischen Dichte einer transgenen Linie im Vergleich zu einer Kontrollpflanze.

	Wildtyp				LegHb			
	Luft	Wasser	Wasser/Luft	Dichte	Luft	Wasser	Wasser/Luft	Dichte
Knolle1	5,4500	0,2700	0,0500	1,0521	13,990	1,0000	0,0710	1,0770
Knolle2	8,9900	0,3300	0,0370	1,0381	15,530	1,1000	0,0710	1,0762
Knolle3	25,7900	1,4700	0,0570	1,0604	30,280	2,2000	0,0730	1,0783
Knolle4	30,7000	1,9300	0,0630	1,0671	50,740	3,2300	0,0640	1,0680
Knolle5	37,4500	1,9900	0,0530	1,0561	59,430	4,0600	0,0680	1,0733
Knolle6	80,9300	4,5000	0,0560	1,0589	67,120	4,3600	0,0650	1,0695
Mittelwert				1,0555				1,0737
STD				0,0090				0,0039
% Stärke	8,9181				12,554			
Erhöhung in %					40,77			

Patentansprüche

1. Transformierte Pflanze, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie mindestens ein Leghemoglobin exprimiert.
- 5 2. Transformierte Pflanze nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das mindestens eine Leghemoglobin aus Pflanzen aus der Gruppe bestehend aus *Lupinus luteus*, *Glycine max*, *Medicago sativa*, *Medicago trunculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*,
10 *Vigna unguiculata*, *Lotus japonicus*, *Psophocarpus tetragonolobus*, *Sesbania rostrata*, *Casuarina glauca* und *Canvalaria lineata* ausgewählt wird.
3. Transformierte Pflanze nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das mindestens eine Leghemoglobin aus *Lotus japonicus* stammt.
- 15 4. Transformierte Pflanze nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie das Leghemoglobin speicherspezifisch exprimiert.
5. Transformierte Pflanze nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie das mindestens eine Leghemoglobin knollenspezifisch und/oder samenspezifisch exprimiert.
20
6. Transformierte Pflanze nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie mindestens eine Sequenz Nr. 1 codierend für ein Leghemoglobin umfasst.

7. Transformierte Pflanze nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie eine Sequenz umfasst, die mit der Sequenz Nr. 1 zu ca. 70 % identisch ist.
- 5 8. Transformierte Pflanze nach einem der vorhergehenden Ansprüche **dadurch gekennzeichnet, dass** sie Stärke und/oder Öl produziert.
9. Transformierte Pflanze nach einem der vorhergehenden Ansprüche **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich um monokotyle Kulturpflanzen, insbesondere der Art Gramineae handelt.
- 10 10. Transformierte Pflanze nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich um dikotyledone Kulturpflanzen, insbesondere der Arten Asteraceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Leguminosae, Rubiaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Theaceae oder Umbelliferae handelt.
- 15 11. Transformierte Pflanze nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich um Kartoffeln, Arabidopsis thaliana oder Raps handelt.
12. Nukleotidsequenz gemäß Sequenz Nr. 1 codierend für Leghemoglobin zur Verwendung in einer Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
13. Genstruktur enthaltend mindestens eine Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 12.
- 20 14. Vektor enthaltend mindestens eine oder mehrere Nukleotidsequenzen gemäß Anspruch 12 oder eine oder mehrere Genstrukturen gemäß Anspruch 13.

15. Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 11 enthaltend mindestens eine Genstruktur gemäß Anspruch 13.
16. Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 11 enthaltend mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 14.
- 5 17. Verfahren zur Veränderung des Gehalts von Speicherstoffen in Pflanzen, **dadurch gekennzeichnet, dass** Pflanzen derart transformiert werden, dass sie mindestens ein Leghemoglobin exprimieren.
- 10 18. Verfahren nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet, dass** das mindestens eine Leghemoglobin aus Pflanzen aus der Gruppe bestehend aus *Lupinus luteus*, *Glycine max*, *Medicago sativa*, *Medicago trunculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Vigna unguiculata*, *Lotus japonicus*, *Psophocarpus tetragonolobus*, *Sesbania rostrata*, *Casuarina glauca* und *Canvalaria lineata* ausgewählt wird.
- 15 19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, **dadurch gekennzeichnet, dass** das mindestens eine Leghemoglobin aus *Lotus japonicus* stammt.
- 20 20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 17 bis 19, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Pflanzen derart transformiert werden, dass sie das mindestens eine Leghemoglobin speicherorganspezifisch exprimiert.
21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 17 bis 20, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Pflanzen derart transformiert werden, dass sie das mindestens eine Leghemoglobin knollenspezifisch und/oder samenspezifisch exprimiert.

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 17 bis 21, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Pflanzen derart transformiert werden, dass sie mindestens eine Sequenz Nr. 1 codierend für ein Leghemoglobin umfasst.
- 5 23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 17 bis 22, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Pflanzen derart transformiert werden, dass sie eine Sequenz umfassen, die mit der Sequenz Nr. 1 zu ca. 70 % identisch ist.
- 10 24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 17 bis 23, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Pflanzen derart transformiert werden, dass sie Stärke und/oder Öl produziert.
25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 17 bis 24, **dadurch gekennzeichnet, dass** monokotyle Kulturpflanzen, insbesondere der Art Gramineae transformiert werden.
- 15 26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 17 bis 24, **dadurch gekennzeichnet, dass** dikotyledone Kulturpflanzen, insbesondere der Arten Asteraceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Leguminosae, Rubiaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Theaceae oder Umbelliferae transformiert werden.
- 20 27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 17 bis 24, **dadurch gekennzeichnet, dass** Kartoffeln, Arabidopsis thaliana oder Raps transformiert werden.

28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 17 bis 27, **dadurch gekennzeichnet, dass** mindestens eine Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 12 für die Transformation verwendet wird.
- 5 29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 17 bis 27, **dadurch gekennzeichnet, dass** mindestens eine Genstruktur gemäß Anspruch 13 für die Transformation verwendet wird.
30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 17 bis 27, **dadurch gekennzeichnet, dass** mindestens ein Vektor gemäß Anspruch 14 für die Transformation verwendet wird.
- 10 31. Verwendung einer Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 11, 15 oder 16 oder des Verfahrens nach einem der Ansprüche 17 bis 30 zur Produktion von Stärke und/oder Öl.

Verfahren zur Veränderung des Gehalts von Speicherstoffen in Pflanzen

Zusammenfassung:

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Veränderung des Gehalts von Speicherstoffen in Pflanzen, wobei Leghemoglobin exprimierende transformierte Pflanzen eingesetzt werden, entsprechende Pflanzen sowie deren Verwendung. Bevorzugterweise wird dazu das Leghemoglobin aus *Lotus japonicus* eingesetzt. Insbesondere werden dann Stärke und/oder Öl produziert.

Sequenz Nr. 1 LEGHEMOGLOBIN aus LOTUS Japonicus

	atgggtttca ctgcgcagca agaggctcta gtgggtagct catacgaaac attcaagaaa	60
	aaccttccta ccaacagtgt ttgttctac accgttatat tggagatagc accaactgca	120
5	aaagacatgt tctcctttct aaaggagtct gggcctaagc atagtcttca gctccaggcc	180
	catgctgaaa aggtttttgc actgactcgt gatgctgccca ctcaactcgt agcaaaagga	240
	gaagtgacac ttgcagatgc cagcttaggt gctgtccacg ttcagaaagc cgttactgat	300
	cctcatttcg tggtggttaa agaagccctg ctcaaacag taaaggaagc agttggggcg	360
	gacgaatgga gtgatgactt gagcaccgct tgggaaggag catatgatgg actagcaact	420
10	gcaattaaga aggcaatggg ttaa	444

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.